Anderson Marcelino de Arandas

Investigação das propriedades fotofísicas do Morin complexado com
cátions de magnésio bivalente e cério trivalente

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do
título de mestre em ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2014

Dedico este trabalho a minha querida mãe Maria Neuda de Arandas, a minha avó Maria José de Luna (carinhosamente Dona Zezé), a minha irmã Danielle Arandas e a minha tia Helena Simões Duarte; pelos anos de incentivo e sacrifício que fizeram por mim a fim de que pudesse realizar meus sonhos e tornar a minha vida um mar de felicidades.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente comigo, nos bons momentos me mostrando o tão bom é a vida e por sempre me amparar nos momentos de desânimo, incerteza e medo.

A minha mãe pelo imenso apoio e dedicação que sempre me deu.

A minha família pelo apoio incondicional.

Ao Profº. Drº. Marcelo Henrique Gehlen pela orientação.

Ao corpo docente, discente, técnico e administrativo do IQSC-USP.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos Amigos e Amigas, como bem descreve nosso saudoso Vinícius de Moraes: *“Tenho amigos que não sabem o quanto são meus amigos. Não percebem o amor que lhes devoto e a absoluta necessidade que tenho deles.”* Em meu coração, está gravada uma descrição detalhada de quem são eles e elas e por que estão guardados lá.

Se o sol explodisse, só daríamos conta oito minutos depois, por que este é o tempo que leva para a luz chegar até a gente. Durante oito minutos ainda haveria claridade e ainda faria calor. Só agora sinto que meus oito minutos com esta fase estavam se esgotando.

(Teobaldo e Alice)

Sumário

Lista de figuras	VII
Lista de tabelas	XII
Resumo	XIII
Abstract	XIV
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	16
1.1 Transições eletrônicas	16
1.2 A lei de Kasha, Princípio de Franck-Condon e o Deslocamento de Stokes ¹⁰	18
1.3 Rendimento Quântico	20
1.4 Supressão da fluorescência molecular	21
1.5 Tempo de vida de fluorescência	22
1.5 Microscopia de Fluorescência	23
1.5.1 Microscopia de Fluorescência confocal.....	24
1.5.2 Microscopia de Fluorescência de campo largo	25
1.6 Os flavonóides: Conceitos Gerais.....	27
1.6.1 Reatividade	28
1.6.2 Transferência de próton intramolecular.....	28
1.6.3 Estudos de complexação do morin com metais	29
1.7 Zeólitas	30
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.1 Reagentes e solventes	34
3.2 Procedimentos Experimentais	35

3.2.1	Preparo das soluções para as medidas de UV-vis e fluorescência..	35
3.2.2	Caracterização fotofísica	35
3.2.3	Microscopia de fluorescência: wide field e confocal	37
3.2.4	Preparação dos sistemas em nanozéolitas	40
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		42
4.1	Sistema Morin com Mg^{2+}	42
4.1.1	UV-vis e fluorescência estacionária	42
4.1.2	Fluorescência resolvida no tempo.....	49
4.2	Sistema morin com Ce^{3+}	53
4.2.1	,Medidas de UV-vis e Fluorescência	53
4.2.2	Fluorescência resolvida no tempo (decaimentos)	59
4.3	Sistema Corante- Mg^{2+} em nanozeólita	62
4.3.1	Medidas de UV-vis e Fluorescência	62
4.3.2	Fluorescência resolvida no Tempo (decaimentos)	64
4.4	Imagens de fluorescência	68
4.4.1	Sistema Morin- Mg^{2+}	68
4.4.2	Sistema corante- Mg^{2+} em nanozeólita	72
4.4.3	Sistema Morin- Mg^{2+} em nanozeólita	74
CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO.....		78
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS		79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo dos estados eletrônicos fundamental, singlete e triplete.	17
Figura 2.- Diagrama de Jablonski ilustrando os diversos níveis de energia e suas transições	18
Figura 3 - Espectros de absorção e emissão ilustrando o deslocamento de Stokes para uma substância qualquer.	19
Figura 4 - Os espectros de absorção e emissão do antraceno representando transições simétricas. . Adaptado de MONDAL ¹⁰ , P. P; DIASPRO, A. Fundamentals of Fluorescence Microscopy: Exploring Life with Light. New York: Springer, 2014.....	20
Figura 5 - Esquema do setup da microscopia de fluorescência confocal. Adaptado de WOLL, D.; BRAEKEN, E.; DERES, A.; DE SCHRYVER, F. C.; UJI-I, H.; HOFKENS, J. Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn? Chemical Society Reviews, v. 38, n. 2, p. 313-328, 2009.	25
Figura 6 - Esquema do setup da microscopia de fluorescência de campo largo. Adaptado de WOLL, D.; BRAEKEN, E.; DERES, A.; DE SCHRYVER, F. C.; UJI-I, H.; HOFKENS, J. Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn? Chemical Society Reviews, v. 38, n. 2, p. 313-328, 2009.	26
Figura 7 - Esqueleto básico dos flavonóides.	27
Figura 8 - Fototautomerização da 3-hidroflavona.	29
Figura 9 - Estrutura do flavonoide Morin (3,5,7,2',4'Pentahidroxiflavona).	29
Figura 10 - Esquema do aparato (ou design óptico) experimental usado na fluorescência resolvida no tempo.	37
Figura 11 - Esquema do aparato (ou design óptico) experimental usado na microscopia de fluorescência confocal (aparato, esquema ótico e detalhamento pertence ao Laboratório de Fluorescência Molecular, LFM-IQSC). Sendo assim temos: APD : fotodiodo de avalanche, BS : divisor de feixe, BSP : prisma divisor de feixe, D : dubleto, DF : filtro dicroico, EXP : expansor, IR : íris, L : lente, LPF : filtro passa baixa, M : espelho, MM : espelho móvel, NF : filtro notch, NLC : cristal não linear, OB : objetiva, OF : fibra óptica, PA : atuador piezoelétrico, PH :	

pinhole, PP : selecionador de pulso, S : amostra, SD : detector de silício, UC : unidade de controle, W : lâmina de onda.	38
Figura 12 - Design óptico experimental usado na microscopia de fluorescência de wide field, (aparato, esquema ótico e detalhamento pertence ao Laboratório de Fluorescência Molecular, LFM-IQSC). Sendo assim temos: BFP : distância focal traseira da objetiva, CAA : conjunto adaptador para câmera, CU : unidade de controle, DF : filtro dicróico, EXP : expansor de feixe, IR : íris ajustável, M : espelho, MM : espelho móvel, NF : filtro notch OB : objetiva, P : prisma, PFD : dubleto para pré-focalização, S : amostra, W : lâmina de onda.	39
Figura 13 - Espectro de absorção do morin puro (—) e do complexo morin-magnésio (demais cores), em metanol à temperatura ambiente.....	42
Figura 14 - Espectro de absorção do mori puro (—) e do complexo morin-magnésio (demais cores) em metanol à temperatura ambiente, após a adição de EDTA.....	43
Figura 15 - Espectros de emissão do morin puro (—) e do complexo morin-magnésio (demais cores) com a adição de magnésio em metanol à temperatura ambiente, onde $\lambda_{exc} = \lambda_{abs, max} = 391 \text{ nm}$	44
Figura 16 - Proposta de estrutura molecular para a associação do morin com Mg^{2+} em metanol à temperatura ambiente nas razões de 1:1 (a) e 1:2 (b).....	45
Figura 17 - Gráfico da razão de intensidade máxima (I/I_0) versus a concentração de magnésio bivalente adicionado a uma solução de morin em metanol a temperatura ambiente.com $\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}$	46
Figura 18 - Gráfico dos espectros de emissão do mori puro e do complexo morin-magnésio com a adição EDTA em metanol à temperatura ambiente, onde $\lambda_{exc} = 391 \text{ nm}$	47
Figura 19 - Gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração EDTA adicionado a solução do complexo morin- Mg^{2+}	48
Figura 20 - Gráfico de decaimentos do (—) morin em metanol com $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$	49
Figura 21 - Decaimento do morin com $[Mg^{2+}] = 12 \mu\text{mol/L}$ com $\lambda_{em} = 495 \text{ nm}$.	50
Figura 22 - Decaimento do morin com $[Mg^{2+}] = 24 \mu\text{mol/L}$ com $\lambda_{em} = 495 \text{ nm}$.	51
Figura 23 - Gráficos de decaimentos do (—) morin, (—) morin com $[Mg^{2+}] = 12 \mu\text{mol/L}$, (—) morin com $[Mg^{2+}] = 24 \mu\text{mol/L}$ em metanol e com $\lambda_{em} = 495 \text{ nm}$	52

Figura 24 - Espectro de absorção do morin puro (—) e do complexo morin-cério (demais cores), em metanol à temperatura ambiente.	53
Figura 25 - Gráfico segundo a equação de Benesi-Hildebrand dos dados de absorbância do morin com Ce^{3+} em metanol à temperatura ambiente	54
Figura 26 - Proposta de estrutura molecular para a associação do morin com Ce^{3+} na proporção 1:1 em metanol à temperatura ambiente.	55
Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência do morin puro (—) e do complexo morin-cério (demais cores) na presença de metanol à temperatura ambiente excitado em: (a) 390nm, (b) 412 nm e (c) 432 nm.....	56
Figura 28 - Estruturas do flavonóide morin na forma (a) livre e (b) dissociada.	57
Figura 29 - Gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de cério trivalente adicionado a uma solução de morin em metanol à temperatura ambiente e excitado em 390 nm.	57
Figura 30 - Gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de cério trivalente adicionado a uma solução de morin em metanol à temperatura ambiente e excitada em 412 nm.	58
Figura 31 - Gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de cério trivalente adicionado a uma solução de morin em metanol à temperatura ambiente e excitada em 432 nm.	58
Figura 32 - Gráficos de decaimentos do morin (—) livre, (—) com $[Ce^{3+}] = 7 \mu\text{mol/L}$, (—) com $[Ce^{3+}] = 14 \mu\text{mol/L}$, e (—) com $[Ce^{3+}] = 20 \mu\text{mol/L}$, com $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$	60
Figura 33 - Proposta de interação entre o cátion metálico e o flavonóide na razão de 1:1.	61
Figura 34 - Estrutura molecular do corante magnesium green (sal de potássio, $C_{33}H_{17}Cl_2K_5N_2O_{13}$).	62
Figura 35 - Espectros de absorção e emissão do magnesium green em solução aquosa à temperatura ambiente, na qual a diferença entre o máximo da absorção e o máximo da emissão (deslocamento de Stokes) foi de 28 nm para esta substância. Sendo o $\lambda_{exc} = \lambda_{abs, max.} = 506 \text{ nm}$	63
Figura 36 - Espectros de emissão do magnesium green (—) e do complexo corante-magnésio (demais cores) com a adição de solução de magnésio aquoso à temperatura ambiente.....	64

Figura 37 - Gráfico de decaimentos do corante magnesium green com $\lambda_{exc} = 534$ nm.	65
Figura 38 - Gráfico de Decaimento do Corante Magnesium green com $[Mg^{2+}] = 1,22 \times 10^{-6}$ mol/L com $\lambda_{em} = 536$ nm.....	66
Figura 39 - Gráfico de Decaimento do Corante Magnesium green com $[Mg^{2+}] = 6,1 \times 10^{-6}$ mol/L com $\lambda_{em} = 536$ nm.....	67
Figura 40 - Imagem de fluorescência do sistema Morin- Mg^{2+} fixado em polivinilpirrolidona com $[Mg^{2+}] = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/L, onde o tamanho da barra corresponde a 2 μm	68
Figura 41 - Espectros de emissão do sistema Morin- Mg^{2+} fixado em polivinilpirrolidona com $[Mg^{2+}] = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/L obtido à temperatura ambiente.	69
Figura 42 - Curva de decaimento triexponencial do sistema Morin- Mg^{2+} fixado em polivinilpirrolidona com $[Mg^{2+}] = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/L obtido à temperatura ambiente.....	70
Figura 43 - Imagem de fluorescência por microscopia de campo largo do sistema morin- Mg^{2+} fixado em polivinilpirrolidona com $[Mg^{2+}] = 1,0 \times 10^{-6}$ mol/L, onde o tamanho da barra corresponde a 2 μm	71
Figura 44 - Imagem de fluorescência por microscopia de campo largo do sistema Morin- Mg^{2+} fixado em polivinilpirrolidona com $[Mg^{2+}] = 1,0 \times 10^{-6}$ mol/L, onde o tamanho da barra corresponde a 2 μm	72
Figura 45 - Imagem de fluorescência por microscopia de campo largo do sistema corante- Mg^{2+} excitado em 473 nm com tamanho da barra de 2 μm . ..	73
Figura 46 - Resultados gráficos do centroide 1 da imagem de fluorescência da figura 45 do sistema corante- Mg^{2+} excitado em 473 nm com tamanho da barra de 2 μm	73
Figura 47 - Imagem de fluorescência por microscopia de campo largo do sistema Morin- Mg^{2+} excitado em 473 nm com tamanho da barra de 2 μm . Onde (a) é a imagem com saturação total, (b) a imagem com desvios e (c) a imagem de transmissão óptica.	74
Figura 48 - Imagem de fluorescência por microscopia de fluorescência de campo largo do sistema morin- Mg^{2+} excitado em 473 nm com tamanho da barra de 2 μm	75

Figura 49 - Resultados gráficos do centroide 2 da imagem de fluorescência da figura 48 do sistema morin-Mg ²⁺ excitado em 473 nm.	76
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e solventes utilizados na pesquisa.	34
Tabela 2 - Parâmetros relativos à curva de decaimento do flavonóide morin..	49
Tabela 3 - Parâmetros relativos à curva de decaimento do flavonóide morin com $[Mg^{2+}] = 12 \mu L$	51
Tabela 4 - Parâmetros relativos à curva de decaimento do flavonóide morin com $[Mg^{2+}] = 24 \mu L$	52
Tabela 5 - Parâmetros relativos às curvas de decaimentos do flavonóide morin: livre e com $[Ce^{3+}] = 7, 14$ e $20 \mu mol/L$ e $\lambda_{em} = 550 nm$	60
Tabela 6 - Parâmetros relativos à curva de decaimento multiexponencial do corante magnesium green com $\lambda_{em} = 536 nm$	65
Tabela 7 - Parâmetros relativos à curva de decaimento multiexponencial do corante magnesium green com $[Mg^{2+}] = 1,22 \times 10^{-6} mol/L$ para 3 componentes com $\lambda_{em} = 536 nm$	66
Tabela 8 - Parâmetros relativos à curva de decaimento multiexponencial do corante magnesium green com $[Mg^{2+}] = 6,1 \times 10^{-6} mol/L$ para 3 componentes com $\lambda_{em} = 536 nm$	67
Tabela 9 - Tempo de vida médio calculado a partir dos parâmetros da curva de decaimento multiexponencial do corante magnesium green e do corante com $[Mg^{2+}] = 1,22 \times 10^{-6}$ e $6,1 \times 10^{-6} mol/L$	68
Tabela 10 - Parâmetros relativos à curva de decaimento triexponencial do sistema Morin- Mg^{2+} fixado em polivinilpirrolidona com $[Mg^{2+}] = 1,0 \times 10^{-4} mol/L$ obtido à temperatura ambiente e excitado em 500 nm.	70

RESUMO

As propriedades fotofísicas dos complexos morin-Mg²⁺ e morin-Ce³⁺, foram investigadas em solução metanólica, em filmes finos de polímeros e em nanozéolitas por técnicas de fluorescência. A associação do metal ao flavonoide ocorre no sítio da carbonila do anel pirona nas razões estequiométricas de 1:1 e 1:2 (magnésio: morin), e esta associação favorece no aumento considerável da intensidade de fluorescência devido à inibição da transferência intramolecular do próton no estado excitado. Os resultados revelaram que os espectros de emissão do complexo morin-Mg²⁺ sofreram um pequeno deslocamento hipsocrômico. Os decaimentos de fluorescência do sistema Morin-Mg²⁺ são triexponenciais para o complexos Morin-Mg²⁺ formados com tempo de vida máximo de 3 ns. O complexo morin-Ce³⁺ é pouco fluorescente e a complexação com o metal leva a supressão de fluorescência devido a sua natureza paramagnética. A estequiometria aparente dominante é de um 1:1 e o decaimento possui um componente de tempo de vida longo de 4-5 ns. Na comparação das propriedades de fluorescência do morin-Mg²⁺ com o indicador *magnesium green* verificamos que ambos são bons indicadores fluorescentes para a microscopia de fluorescência podendo esses complexos serem usados na detecção de Mg²⁺ em nanozeólita e outros sistemas

Palavras-chave: Morin, Magnésio bivalente, Cério trivalente, Tempo de vida, Fluorescência, Intermitência de fluorescência.

ABSTRACT

The photophysical properties of the molecular complexes of morin with Mg^{2+} and Ce^{3+} cations in methanol solution as well as in thin polymeric films and nanozeolites have been investigated by using fluorescence spectroscopy and microscopy. The association of morin with Mg^{2+} occurs at the (4)-carbonyl group of the pyrone ring at 1:1 and 1:2 stoichiometric ratio. The complexes have shown an increase of the emission quantum yield by precluding the excited state deactivation through the intramolecular proton transfer process. The fluorescence decays of the complexes are non exponential due to the presence of more than one emission species and the average decay time found was about 3 ns. On the other hand, the addition of Ce^{3+} to morin solution resulted in fluorescence quenching ascribed to 1:1 non emissive complex due to the paramagnetic nature of the metal cation. The fluorescence properties of morin- Mg^{2+} complex have been compared with the standard fluorescence indicator magnesium green. The results pointed out that morin- Mg^{2+} may be used as an alternative low cost indicator of Mg^{2+} in homogenous as well as in microheterogeneous media.

Keywords: Morin, Magnesium bivalent, Trivalent cerium, Lifetime, Fluorescence, Fluorescence intermittency.

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Alguns processos de luminescência são conhecidos pelo homem desde tempos remotos, tais como: a aurora boreal, a luz do vaga-lume, fogos de artifício, bioluminescência de fungos e plantas. O termo luminescência (do latim *Lumen* = luz) faz menção à propriedade de uma substância absorver níveis discreto de energia (fótons) para atingir estados excitados pela promoção de elétrons de valência para estados de maior energia, seguido de posterior retorno ao estado fundamental pela emissão de fótons.

As áreas de aplicação dos métodos fluorimétricos são (bio)sensores^{1; 2; 3}, biomedicina^{4; 5; 6}, agricultura⁷, polímeros⁸, entre outras. Para entender o conceito de fluorescência e poder diferenciá-la da fosforescência é necessário entender a natureza das transições eletrônicas envolvidas na formação do estado excitado em ambos os fenômenos.

1.1 Transições eletrônicas

O fenômeno da fotoluminescência pode ocorrer por fluorescência ou fosforescência dependendo da natureza das transições eletrônicas do estado excitado. O princípio da exclusão de Pauli afirma que dois elétrons em um mesmo átomo não podem apresentar o mesmo conjunto de números quânticos, isto é, deve haver somente dois elétrons alocados por orbital eletrônico, possuindo spins com orientação contrária (spins emparelhados). Então, quando uma molécula apresenta todos os seus orbitais eletrônicos preenchidos de forma emparelhada, este estado é denominado singlete, pois possui como propriedade característica; o estado diamagnético (ausência de momento magnético sobre ação de um campo magnético). As substâncias paramagnéticas são influenciadas por momentos magnéticos. Para que isto ocorra estas devem apresentar um número de elétrons ímpar, representando o estado triplete. Em um estado triplete o elétron desemparelhado pode assumir duas orientações possíveis sobre a ação de um campo magnético. Tal estado possui dois elétrons com spins de mesma orientação mesmo em orbitais distintos.

Assim que um elétron é excitado do estado fundamental (estado de menor energia) para o estado excitado (estado de maior energia) a configuração emparelhada é mantida, mesmo que os elétrons permaneçam em orbitais distintos. Uma desativação deste estado excitado por processo radiativo é denominada de emissão de fluorescência. Entretanto, se a excitação do estado singlete gerar uma configuração desemparelhada pela inversão do spin do elétron excitado denomina-se este novo estado de estado triplete excitado. Sua desativação radiativa forma o que caracteriza o processo de fosforescência. Estas observações podem ser exemplificadas na Figura 1.

Figura 1 - Esquema representativo dos estados eletrônicos fundamental, singlete e triplete.

A melhor ferramenta para interpretar a natureza dos processos fotofísicos é o diagrama de Jablonski (diagrama construído na primeira metade do século XX pelo físico polonês Aleksander Jablonski (1898 - 1980) conforme apresentado na Figura 2.) que ilustra de maneira detalhada as várias formas de combinação de etapas mecânicas que levam à excitação e desativação dos estados excitados de uma molécula. Neste diagrama duas formas de desativação são processos radiativos (fluorescência e fosforescência), pois envolvem a emissão de fótons. No fenômeno da fluorescência, os elétrons são mantidos emparelhados mesmo no estado ativado, o que ocasiona um tempo de vida curto, em torno de 10^{-9} segundos (transição permitida por spin)⁹.

Quanto à fosforescência, o tempo de vida na fase excitada é maior devido à inversão do spin do elétron promovido, fazendo com que este estado apresente uma menor energia, garantindo assim um tempo de vida maior, ou

seja, superior a 10^{-8} segundos, pois trata-se de uma transição não-permitida. Os demais processos são não-radiativos e apresentam taxa de transição em torno de 10^{-12} segundos. São eles: Relaxação vibracional, cruzamento intersistemas, conversão externa e interna⁹.

Figura 2.- Diagrama de Jablonski ilustrando os diversos níveis de energia e suas transições.⁹

1.2 A lei de Kasha, Princípio de Franck-Condon e o Deslocamento de Stokes¹⁰

A lei de Kasha afirma que independentemente da natureza da excitação eletrônica, a emissão ocorre a partir do mais baixo estado de vibração do estado eletrônico excitado.

Quando um elétron é promovido do estado fundamental, S₀, para o estado excitado, S₁, a emissão de fluorescência, a transição S₁ → S₀, só é esperada a partir do mais baixo estado vibracional do estado excitado. Isto é devido ao fato de que as funções de onda dos estados vibracionais excitados ficam muito próximos e têm energias semelhantes, resultando na sobreposição substancial, que ocasiona uma transição não-radiativa para o estado vibracional mais baixo do estado excitado (conversão interna). Finalmente, a

molécula relaxa de forma radiativa para o estado fundamental, S_0 , a partir do estado vibracional mais baixo do estado excitado, dando origem ao processo de fluorescência.

A relaxação da estrutura para o nível vibracional mais baixo do estado excitado, S_1 , antes de ocorrer a desativação radiativa, levam ao conhecido deslocamento de Stokes. O mesmo afirma que a emissão sempre ocorre em comprimentos de onda maiores, ou de forma equivalente a menor energia, de tal forma que a quantidade de energia absorvida é maior do que a emitida, como se pode observar na figura abaixo.

Figura 3 - Espectros de absorção e emissão ilustrando o deslocamento de Stokes para uma substância qualquer.

O princípio de Frank-Condon é essencialmente uma manifestação da aproximação de Born-Oppenheimer e afirma que todas as transições envolvendo os estados fundamental e excitado são verticais. Um exemplo é mostrado na figura a seguir.

Figura 4 - Os espectros de absorção e emissão do antraceno representando transições simétricas. . Adaptado de MONDAL¹⁰, P. P; DIASPRO, A. **Fundamentals of Fluorescence Microscopy**: Exploring Life with Light. New York: Springer, 2014.

1.3 Rendimento Quântico

A eficiência quântica de fluorescência de uma molécula ou rendimento quântico (ϕ) é definido como sendo a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons que foram absorvidos. A equação exposta abaixo demonstra o cálculo de rendimento quântico considerando o valor das constantes de velocidades em relação aos processos pelos quais o estado singlete excitado de menor energia pode ser desativado. Assim, o rendimento quântico de fluorescência pode ser expresso por:

$$\phi = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fótons emitidos}}{\text{n}^\circ \text{ de fótons absorvidos}} = \frac{k_f}{k_f + \sum k_i} \quad (1)$$

Na expressão acima k_f é a constante de velocidade de fluorescência e $\sum K_i$ é o somatório das constantes de velocidades dos outros processos que desativam o estado singlete.

Na prática, o rendimento quântico de fluorescência de uma molécula é obtido por comparação da intensidade de fluorescência integrada da molécula investigada com uma molécula de referência de rendimento quântico conhecido, dada pela seguinte equação ^{11; 12; 13}:

$$\Phi = \Phi_f \frac{I}{I_f} \frac{A_f}{A} \frac{n^2}{n_f^2} \quad (2)$$

Onde,

Φ = rendimento quântico de fluorescência

I = Intensidade de fluorescência integrada

A = Absorbância

n = Índice de refração

O subscrito f na equação 2 indica que os valores são referentes aos dados da molécula de referência (padrão) e que os valores da amostra devem ser obtidos nas mesmas condições que o do padrão.

1.4 Supressão da fluorescência molecular

Este processo faz referência à interação do fluoróforo com determinadas substâncias supressoras que interagem com o fluoróforo e geram como resultado uma diminuição do rendimento quântico de emissão.

O fenômeno da supressão pode ser classificado geralmente como estático ou dinâmico¹⁴. A supressão de fluorescência estática implica na formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental. Enquanto que a supressão de fluorescência dinâmica a interação entre o supressor e o fluoróforo ocorre durante o estado excitado.

A supressão de fluorescência dinâmica é descrita em termos da equação de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_D [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (3)$$

No qual I_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do supressor, I a intensidade de fluorescência na presença do supressor, τ_0 e τ são, respectivamente, o tempo de vida da espécie fluorescente na ausência e na presença do supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor na solução analisada e $k_q \tau_0$ é a constante de supressão bimolecular de Stern-Volmer e a mesma pode ser representada também por k_D .

1.5 Tempo de vida de fluorescência

O tempo de vida de fluorescência de uma molécula é definido como o tempo médio em que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Por conseguinte, o tempo de vida de fluorescência é definido como,

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (4)$$

Onde k_r representa a constante de relaxação por meio de transição radiativa e k_{nr} é o cumulativo das constantes de relaxação dos processos não-radiativos¹⁰

As medidas de fluorescência resolvida no tempo podem ser registradas por duas técnicas, sendo uma no domínio tempo e a outra no domínio da frequência^{15; 16}. No primeiro caso, a excitação é realizada com um pulso de luz e a medida da fluorescência é registrada no tempo. No segundo caso, a excitação é feita com luz modulada e a fluorescência em termos do tempo é gerada a partir da resposta de frequência e fase de emissão¹⁷.

Ao ser comparado com a fluorescência no estado estacionário a resolvida no tempo apresenta um ganho considerável de informação, pois, faz uso de uma escala temporal muito curta¹⁷. Contudo, a mesma requer o uso de uma aparelhagem eletrônica e ótica de considerável sofisticação.

As medidas provenientes desta técnica são obtidas em termos de intensidade de fluorescência $I(t)$, sendo esta utilizada como variável diretamente proporcional a $n(t)$ (número de moléculas excitadas no tempo (t))¹¹. Desta forma, o decaimento exponencial da fluorescência em relação a intensidade pode ser expresso de acordo com a equação 5:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (5)$$

Em que $I(t)$ é a intensidade de fluorescência, I_0 a intensidade de fluorescência no tempo zero e τ é o tempo de decaimento ou simplesmente tempo de vida da espécie emissiva.

1.5 Microscopia de Fluorescência

A técnica de microscopia de fluorescência utiliza de fontes de luz para irradiar uma amostra contendo espécies fluorescentes (fluoróforos) que emitem luz em um comprimento de onda maior (na faixa do visível) em relação ao absorvido. O imageamento da fluorescência de um plano da amostra em um sensor de luz dá origem à chamada imagem de fluorescência. O processo de imageamento pode ser feito por diferentes técnicas ópticas. Este método de investigação apresenta grande aplicação nas ciências médicas e biológicas^{18; 19}, principalmente pela capacidade inerente para direcionar sondas fluorescentes de moléculas em baixas concentrações com alta seletividade e especificidade¹⁵. A microscopia de fluorescência também é uma ferramenta poderosa no estudo de sistemas químicos, tais como colóides^{20,21}, polímeros conjugados²², tingimento de fibras²³, etc.

Até poucos anos, no entanto, a resolução da microscopia de fluorescência foi conceitualmente e espacialmente limitada pelo comprimento de onda da luz, que é metade do comprimento de onda da luz, no limite de difração $\Delta r \approx \lambda / (2n \sin \alpha)$, onde λ é o comprimento de onda da luz usado, n o índice de refração do meio circundante, e α o semiângulo de foco da objetiva. Assim, os detalhes de estruturas menores que estão nesta dimensão não podem ser vistos pelo microscópio óptico de campo largo, impedindo a

observação espacial abaixo do limite de difração¹⁹. No entanto, trabalhos recentes já estão sendo realizados com sinais de fluorescência para além do limite de difração de dezenas de nanômetros, ou seja, de resolução de subdifração^{24; 25, 26, 27}.

Existem diversas técnicas de microscopia de fluorescência que podemos citar: A microscopia de fluorescência de campo largo (do inglês *wide-field fluorescence microscopy*), microscopia de fluorescência por reflexão total interna (do inglês *total internal reflection fluorescence microscopy* - TIRFM), microscopia de fluorescência confocal (do inglês *confocal fluorescence microscopy*), microscopia de depleção por emissão estimulada (do inglês *stimulation emission depletion microscopy* - STED), microscopia de imageamento do tempo de vida de fluorescência (do inglês *fluorescence lifetime microscopy* - FLIM), entre outras. No presente trabalho foram utilizadas as técnicas de microscopia de fluorescência de campo largo e confocal, que serão apresentadas a seguir.

1.5.1 Microscopia de Fluorescência confocal

Na microscopia de fluorescência confocal a construção da imagem é feita varrendo-se ponto a ponto a região de interesse da amostra e em cada um desses pontos é feita a aquisição dos fótons de fluorescência por um sensor de luz pontual, que usualmente é uma fotomultiplicadora ou fotodiodo avalanche (APD), conforme a figura abaixo. Nesta técnica, um *pinhole* é usado para excluir a luz que emana de fora do plano focal da amostra²⁵, o que favorece em um aumento da capacidade de secionamento desta técnica, ou seja, a relação sinal/ruído é aumentada.

Figura 5 - Esquema do setup da microscopia de fluorescência confocal. Adaptado de WOLL, D.; BRAEKEN, E.; DERES, A.; DE SCHRYVER, F. C.; UJI-I, H.; HOFKENS, J. Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn? **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 313-328, 2009.

A peça que desempenha também um papel importante no funcionamento do microscópio confocal é a objetiva, visto que a mesma é responsável por: focar o feixe de laser em um ponto pequeno da amostra, coletar a fluorescência emitida pelos fluoróforos presentes no interior da amostra e direcionar parte da fluorescência emitida para o pinhole de detecção que é responsável por construir as imagens da amostra²⁶.

1.5.2 Microscopia de Fluorescência de campo largo

Na microscopia de fluorescência de *campo largo*, uma ampla região da amostra é iluminada e imageada, sem o uso do pinhole e sem varredura da excitação, sendo um sensor de imagem matricial, uma câmera do tipo CCD (dispositivo de carga acoplado, do inglês *charge-coupled device*) resfriada, responsável por realizar a aquisição do sinal de fluorescência, que é feita simultaneamente em todos os pixels do sensor de imagem, conforme figura abaixo. A resolução temporal das imagens geradas são limitadas pela taxa de aquisição de frames da câmara CCD²⁸. Logo, é importante salientar que à

medida que a resolução espacial melhorar, a resolução temporal também deve melhorar ao mesmo ritmo, para que assim se possam ter imagens com boa resolução de detalhes²⁹.

Figura 6 - Esquema do setup da microscopia de fluorescência de campo largo. Adaptado de WOLL, D.; BRAEKEN, E.; DERES, A.; DE SCHRYVER, F. C.; UJI-I, H.; HOFKENS, J. Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn? **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 313-328, 2009.

Uma vantagem adicional desta técnica é que muitas moléculas podem ser estudadas em paralelo; portanto, o número de moléculas estatisticamente relevantes pode ser coletado muito mais rápido do que em uma abordagem confocal²⁸. Sendo assim, a microscopia de fluorescência de campo largo também é aplicada no estudo de processos fotofísicos e fotoquímicos de moléculas individuais³⁰.

1.6 Os flavonóides: Conceitos Gerais

Os flavonóides ou também denominados de bioflavonóides pertencem a uma classe de compostos polifenólicos que estão presentes em diversas espécies de plantas, sabendo-se que a estrutura de mais de 4000 tipos de flavonóides já foram identificados³¹. Estas substâncias são acumuladas em órgãos anatômicos específicos, tais como raízes, sementes, folhas, frutos, cascas e flores. No entanto, estas substâncias estão presentes em maiores concentrações nos frutos e sementes e estão localizados internamente na célula nos vacúolos³². A estrutura básica comum a todos os flavonóides (**figura 1.6**) é constituída por 15 átomos de carbono dispostos em três anéis (esqueleto C₆-C₃-C₆), marcados como A, B e C, sendo dois desses anéis aromáticos condensados.

Figura 7 - Esqueleto básico dos flavonóides.

As principais classes de flavonóides são: flavonas, flavonóis (classe a qual pertence o morin), flavanonas, flavanóis, antocianidinas, isoflavonas, dihidrochalcona e chalcona³³. Essas variadas classes de flavonóides são distintas apenas pelo estado de oxidação da ligação do carbono três (C-3) do heterociclo³⁴, e a diferenciação de cada composto é realizada de acordo com o número e a natureza dos substituintes que se ligam aos anéis.

Este grupo de substâncias apresenta um conjunto considerável de propriedades biologicamente ativas que justificam o intenso estudo realizado em torno delas. Algumas das propriedades de interesse foram estudadas *in vitro*, são elas: antiinflamatórias, antialérgicas, antivirais e anticarcinogênicas³⁵.

1.6.1 Reatividade

O anel C do esqueleto básico dos flavonóides (denominado de grupo Pirona) é o grupamento envolvido nas principais reações susceptíveis aos flavonóides. Enquanto que os anéis condensados A e B reagem como anéis aromáticos livres para alguns casos, o que implica em uma solubilidade moderada destes compostos em água. Contudo, esforços estão sendo realizados para aumentar a solubilidade destes compostos em água, visando aplicações farmacológicas^{36; 37; 38}.

A alta reatividade química dos flavonóides lhe permite capturar radicais livres, agir como antioxidantes e se complexar com metais. Os estudos envolvendo a associação de flavonóides com metais tem assumido uma posição de destaque, visto que a associação flavonóide-metal é importante no mecanismo de ação antioxidante³⁹.

1.6.2 Transferência de próton intramolecular

Quando uma molécula é levada ao seu estado excitado, algumas de suas propriedades podem ser alteradas, como exemplo pode-se citar a força ácida ou básica dos grupos funcionais. Sendo, o rearranjo de prótons possíveis de ocorrerem, trataremos de um exemplo particular de transferência de próton intramolecular intrínseca da 3-hidroxiavona.

A denominação de transferência de próton intramolecular intrínseca advém do fato de que no estado fundamental existe uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio do grupo receptor e do grupo doador. Ao haver a excitação da molécula 3-hidroxiavona, a mesma sofre tautomerização por transferência de próton intramolecular entre os grupos carbonila e hidroxila adjacentes do anel heterocíclico (figura 8).

Figura 8 - Fototautomerização da 3-hidroflavona.

Este processo de fototautomerização ocasiona a desativação do estado S_1 em flavonóides hidroxilados o que gera como consequência uma baixa fluorescência para estas substâncias.

1.6.3 Estudos de complexação do morin com metais

O flavonóide morin (3,5,7,2',4'-pentahidroxi-flavona) é da família Moraceae e é encontrado em alimentos de origem vegetal e caracteriza-se por ser um antioxidante isomérico da quecertina⁴⁰. A Figura 9 ilustra a estrutura molecular do morin.

Figura 9 - Estrutura do flavonoide morin (3,5,7,2',4'-pentahidroxi-flavona).

O flavonóide morin (3,5,7,2',4' - pentahidroxi-flavona) complexado com metais tem sido alvo de estudos nos últimos anos, sobre os quais pode-se destacar o monitoramento online de alumínio em água potável⁴¹ e misturas iônicas⁹, investigação espectroscópica e modelagem molecular de lantanídeos trivalentes^{42; 43}, interação morin-Bi(III) com o DNA⁴⁴, estudos fotoluminescentes

de morin adsorvido em membrana de alumina⁴⁵, caracterização de albumina de soro humano com complexo de morin^{46; 47}, estudo de atividade antioxidante⁴⁸ e anticâncer⁴⁹, desenvolvimento de sensor óptico⁵⁰, dentre outras investigações.

Subsequentemente, outros estudos de morin interagindo com outros materiais são relatados, com destaque para a caracterização do dióxido de titânio^{51; 52}, dendrímeros⁵³, e no mecanismo de proteção contra os raios ultravioleta⁵⁴.

Neste contexto, um detalhamento da fluorescência do morin complexado com magnésio e cério é de grande relevância para se compreender o comportamento dessa substância na presença destes cátions.

1.7 Zeólitas

As zeólitas (termo oriundo do grego *zeo*, “a ferver”, e *lithos*, “Pedra”, significando pedra que ferve) são aluminosilicatos cristalinos unidos nos vértices através do átomo de oxigênio que compartilha grupos tetraédricos de AlO_4 e SiO_4 formando uma rígida rede tridimensional denominada de estrutura da zeólita⁵⁵. As zeólitas “clássicas” apresentam canais e cavidades intercaladas de dimensões moleculares de composição do tipo $\text{M}_x (\text{AlO}_2)_x (\text{SiO}_2)_y \cdot z \text{H}_2\text{O}$, em que M pode ser, por exemplo, um cátion monovalente (H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+), necessários para a compensação de carga.

A incorporação de moléculas de corante orgânico em hospedeiros que atuam como suportes sólidos tem atraído muito interesse devido à possibilidade de obtenção de estruturas estáveis⁵⁶, com aplicações potenciais em diferentes campos. Estes incluem o desenvolvimento de dispositivos e materiais fotônicos, tais como cavidades de guia de onda do laser, sistemas de memória ópticos, dispositivos eletroluminescentes, sistemas de antena artificiais, detectores de radiação, interruptores ópticos, e na construção de sensores ópticos⁵⁷. Baseado nesta informação, as zeólitas se mostram como materiais convenientes a este propósito. Uma parte do trabalho realizado dedica-se a investigar a fluorescência de um corante em nanozeólita sintética LUCIDOT NZL 40LP 3533 (suporte sólido), após complexação com magnésio bivalente.

CAPÍTULO 2:

OBJETIVOS

Mg^{2+}

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar as propriedades fotofísicas em solução e em filmes finos do flavonóide morin livre e complexado com cátions de magnésio bivalente e cério trivalente, visando aplicações futuras destes compostos como sondas fluorescentes destes cátions.

2.2 Objetivos específicos

1. Examinar o comportamento espectral dos complexos por espectroscopia de absorção (UV-vis) e emissão;
2. Avaliar e comparar as propriedades fotofísicas por espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo para cada sistema;
3. Efetuar o cálculo de rendimento quântico para cada uma das espécies investigadas;
4. Examinar a formação de complexos flavonóide-Me (onde Me = Mg^{2+} ou Ce^{3+}) em micro e nanoregiões por microscopia de fluorescência;
5. Investigar por microscopia de fluorescência de campo largo a interação do sistema corante e flavonóide inserido em nanozeólita após complexação com magnésio bivalente.

CAPÍTULO 3:

PARTE EXPERIMENTAL

3 PARTE EXPERIMENTAL

A seguir será descrito os materiais e procedimentos para o estudo das propriedades fotofísicas do flavonóide morin complexado com cátions de Mg^{2+} e Ce^{3+} e um ensaio de corante inserido em nanozélita.

3.1 Reagentes e solventes

Para a preparação das amostras, foram empregados alguns reagentes e solventes, conforme descrito na Tabela 3.1.

Tabela 1 - Reagentes e solventes utilizados na pesquisa.

Reagente ou Solvente	Fórmula	Fornecedor	Pureza (%)
Nitrato de magnésio hexahidratado	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Fluka	99
Morin	$C_{15}H_{10}O_7$	Aldrich	95
Metanol	CH_4O	J.T. Baker	100
EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Aldrich	98
PVP (polivinilpirrolidona)	$(C_6H_9NO)_n$	Aldrich	98
Isopropanol (2-propanol)	C_3H_8O	Mallinckrodt	99
Cloreto de Cério heptahidratado	$CeCl_3 \cdot 7H_2O$	Aldrich	99,5
Magnesium green	$C_{33}H_{17}Cl_{12}K_5N_2O_{13}$	Aldrich	95
Zeólitas	$H_{3,6}K_{5,6}(AlO_2)_9(SiO_2) \cdot 21H_2O$	LUCIDOT NZL 40LP 3533	99

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 Preparo das soluções para as medidas de UV-vis e fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas em soluções de morin em metanol. Foram adicionadas pequenas quantidades de uma solução aquosa do sal do cátion. Inicialmente preparou-se soluções estoque de concentração 10^{-3} M. Posteriormente, as medidas de absorção e emissão foram efetuadas após a diluição da solução estoque do flavonóide para uma concentração $5,0 \times 10^{-5}$ M, sobre a qual foram adicionadas alíquotas da solução de magnésio após diluição da solução base para uma concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ M.

3.2.2 Caracterização fotofísica

Para a investigação das propriedades fotofísicas da complexação do flavonóide com magnésio bivalente e cério trivalente foram empregadas as técnicas de espectroscopia de absorção (UV-vis) e de fluorescência (estacionária e resolvida no tempo).

3.2.2.1 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-vis)

O equipamento utilizado nas medidas espectroscópicas de absorção foi um espectrofotômetro de absorção óptica Jasco modelo V-630, que apresenta uma fonte de radiação que abrange a emissão compreendida desde o ultravioleta próximo (lâmpada de excitação de deutério) ao infravermelho próximo (lâmpada de excitação de tungstênio), no intervalo de comprimentos de onda de 190 a 1100 nm.

Os espectros de absorção do UV-Vis da solução do complexo flavonóide-metal foram registrados por intermédio do uso de uma cubeta de quartzo de caminho ótico com 1 cm, à temperatura ambiente.

3.2.2.2 Espectroscopia de fluorescência estacionária

As medidas fluorimétricas foram registradas utilizando-se um espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500, que possui uma lâmpada de excitação de xenônio. Para tanto, os espectros excitação-emissão foram obtidos diretamente das substâncias em solução metanólica usando uma cubeta de quartzo que apresenta um caminho ótico de 1 cm, na faixa de comprimentos de onda entre 300 e 800 nm (em intervalos de 5 nm) apresentando uma velocidade de varredura de 1200 nm/min. As análises foram efetuadas à temperatura ambiente. O rendimento quântico de fluorescência do complexo morin-Mg²⁺ foi calculado a partir do uso do sulfato de quinina ($\phi = 0,577$) como padrão.

3.2.2.3 Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

As medidas de decaimento de fluorescência das amostras foram obtidas utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico usando excitação pulsada em 400 nm, dobrando-se a frequência da radiação proveniente de um laser Ti (Coherent, Mira 900) operando em regime *modelocked* sintonizado em 800 nm (Coherent, Verdi SW) em um cristal não linear. Um detector MCP-PM (R3809U-50, Hamamatsu) é responsável por coletar os fótons emitidos. Um esquema do aparato experimental é apresentado a seguir.

Figura 10 - Esquema do aparato (ou design óptico) experimental usado na fluorescência resolvida no tempo.

Para a investigação do comportamento fotofísico dos complexos (flavonóide-cátion) foi utilizada a técnica de contagem de fótons correlacionados no tempo (TCSPC - *Time-Related Single Photon Counting*) que visa determinar o tempo de vida médio do estado excitado singlete (S_1).

3.2.3 Microscopia de fluorescência: wide field e confocal

As medidas por microscopia de fluorescência foram efetuadas sobre filmes finos (composto de polímero (PVP) + flavonóide + cátion (Mg^{2+} ou Ce^{3+}) ou um sistema de corantes inseridos em nanozeólitas) fixados em lamínulas de vidro (22 x 22 mm) pelo método de *spin-coating* (3500 rpm, 45s) à temperatura ambiente. Antes da fixação dos filmes sobre as lamínulas, as mesmas foram cuidadosamente limpas sonicando-se com solução de hidróxido de sódio 1 molar, etanol de pureza espectroscópica e água deionizada e ao fim destas três lavagens a mesmas foram secas com gás nitrogênio puro.

3.2.3.1 Microscopia de fluorescência confocal

As medidas de fluorescência por microscopia confocal foram realizadas em um microscópio invertido Olympus modelo IX71 que buscou caracterizar as amostras em termos de resolução espacial, temporal e espectral. O aparato experimental usado na aquisição destas informações pode ser observado na figura abaixo.

Figura 11 - Esquema do aparato (ou design ótico) experimental usado na microscopia de fluorescência confocal (aparato, esquema ótico e detalhamento pertence ao Laboratório de Fluorescência Molecular, LFM-IQSC). Sendo assim temos: **APD**: fotodiodo de avalanche, **BS**: divisor de feixe, **BSP**: prisma divisor de feixe, **D**: duplento, **DF**: filtro dicróico, **EXP**: expansor, **IR**: íris, **L**: lente, **LPF**: filtro passa baixa, **M**: espelho, **MM**: espelho móvel, **NF**: filtro notch, **NLC**: cristal não linear, **OB**: objetiva, **OF**: fibra óptica, **PA**: atuador piezoelétrico, **PH**: pinhole, **PP**: selecionador de pulso, **S**: amostra, **SD**: detector de silício, **CU**: unidade de controle, **W**: lâmina de onda.

As imagens e espectros foram obtidos usando-se do laser CW em 405 nm, CUBE-Coherent. Enquanto que os decaimentos foram obtidos com excitação pulsada em 400 nm, dobrando-se a frequência da radiação

Posteriormente os dados gerados das imagens foram tratados usando um software programado em Matlab (desenvolvido no Laboratório de Fluorescência Molecular, LFM), de onde se determinou algumas informações, tais como: número de ocorrências dos estados ligados e desligados (*on/off*) e histograma de evolução da fluorescência, enfim, as informações oriundas da intermitência ao longo do tempo para a interação de corante e flavonóide inserido em nanozéolita.

3.2.4 Preparação dos sistemas em nanozéolitas

A preparação destes sistemas consistem em duas etapas, na primeira etapa temos a troca do íon potássio inserido na nanozeólita por magnésio e na segunda etapa a inserção do corante na nanozeólita.

Na etapa de troca de íons, foi adicionada uma solução de nitrato de magnésio hexahidratado a nanozólita, e a dispersão formada é agitada por cinco minutos e em seguida a mesma foi sonicada à temperatura de 60 °C por 30 minutos. Logo após, a amostra foi centrifugada e seca a 80 °C.

Na etapa de inserção do corante, a solução do corante é adicionada a nanozeólita e esta dispersão é sonicada e em seguida a mesma é agitada por 24 horas. Para finalizar o processo, realizou-se a lavagem desta dispersão que foi seca a 80 °C durante um período de um dia.

As lâminas analisadas foram preparadas a partir de uma dispersão pelo método do *spin-coating* (3000 rpm, 50s) à temperatura ambiente.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistema Morin com Mg^{2+}

4.1.1 UV-vis e fluorescência estacionária

A adição de Mg^{2+} à solução diluída de morin ocasiona variação no espectro de absorção eletrônica da solução. A figura 13 ilustra o comportamento espectral do morin e do complexo morin-magnésio em solução metanólica.

Figura 13 - Espectro de absorção do morin puro (—) e do complexo morin-magnésio (demais cores), em metanol à temperatura ambiente.

Os espectros dos flavonóides puro e na presença de magnésio apresentaram duas bandas de absorção, a primeira com comprimento de onda máximo em torno de 265 nm e a segunda com comprimento de onda máximo em aproximadamente 400 nm. A primeira banda de absorção praticamente não sofreu alteração, enquanto que na segunda banda houve um aumento da absorbância e um pequeno deslocamento para um comprimento de onda maior (deslocamento batocrômico) com a adição de Mg^{2+} indicando uma interação

entre o flavonóide com o cátion Mg^{2+} . Pode-se notar também que a adição de magnésio gerou um deslocamento de 15 nanômetros para a região do espectro de menor energia, mas não alterou a forma da banda de absorção. Em geral, o aumento da concentração de magnésio na solução ocasiona um leve aumento da absorbância.

A figura 14 apresenta os espectros na região do UV-vis do complexo morin- Mg^{2+} em metanol após a adição de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), complexante de Mg^{2+} .

Figura 14 - Espectro de absorção do morin puro (—) e do complexo morin-magnésio (demais cores) em metanol à temperatura ambiente, após a adição de EDTA.

Uma diminuição da absorbância nas duas bandas características do morin ocorre com a adição de EDTA. Porém, apenas a segunda banda sofre um deslocamento de 14 nm para um comprimento de onda menor (deslocamento hipsocrômico), em virtude da substância do EDTA sequestrar os íons de Mg^{2+} do complexo e liberar o flavonóide na forma livre. Isto acontece porque o EDTA tem preferência sobre os íons de magnésio. Estes resultados permitem concluir que a associação Morin- Mg^{2+} é reversível e mais fraca que a associação do íon magnésio com EDTA.

Os espectros de emissão de fluorescência com excitação no comprimento de onda máximo da segunda banda de absorção ($\lambda = 391 \text{ nm}$) do morin em diferentes concentrações de magnésio bivalente são apresentados na figura 15.

Figura 15 - Espectros de emissão do morin puro (—) e do complexo morin-magnésio (demais cores) com a adição de magnésio em metanol à temperatura ambiente, onde $\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{abs, max}} = 391 \text{ nm}$.

Da figura 15 observamos que a relação é de proporcionalidade direta até certo limite, ou seja, a intensidade de fluorescência aumenta à medida que se aumenta a $[\text{Mg}^{2+}]$. O comprimento de onda máximo da banda de emissão do morin ($\lambda = 547 \text{ nm}$) foi deslocado para a região do azul (deslocamento

hipsocrômico) com a adição do Mg^{2+} que passa a apresentar um comprimento de onda máximo igual a 495 nm. A associação do metal ao flavonóide ocorre possivelmente no sítio da carbonila do anel pirona nas razões estequiométricas de 1:1 e 1:2 (Magnésio: Morin), e esta associação favorece o aumento considerável da intensidade de fluorescência devido à inibição da transferência intramolecular do próton no estado excitado^{34; 39; 43}, conforme figura abaixo.

Figura 16 - Proposta de estrutura molecular para a associação do morin com Mg^{2+} em metanol à temperatura ambiente nas razões de 1:1 (a) e 1:2 (b).

Os rendimentos quânticos das amostras foram determinados usando como padrão o sulfato de quinona ($\phi = 0.577$) e obteve-se o seguinte: o rendimento do morin puro foi de 0,0052 enquanto da forma complexada com magnésio foi de 0,011, indicando que a complexação favoreceu a um aumento significativo de fluorescência.

Os dados relativos à razão de intensidade (I/I_0) versus $[Mg^{2+}]$ estão apresentados na figura 17. Pode-se notar que os pontos formados tendem a descrever um comportamento de saturação com rendimento quântico de emissão muito similares. Esse comportamento é consistente com a presença de dois equilíbrios de espécies complexadas em solução.

Figura 17 - Gráfico da razão de intensidade máxima (I/I_0) versus a concentração de magnésio bivalente adicionado a uma solução de morin em metanol a temperatura ambiente. com $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$.

A figura 18 apresenta o comportamento dos espectros de emissão de fluorescência do complexo morin- Mg^{2+} após a adição de EDTA. A intensidade de fluorescência relativa do complexo flavonoide-metal é inversamente proporcional com o aumento da concentração de EDTA.

Figura 18 - Gráfico dos espectros de emissão do complexo morin-magnésio com a adição EDTA em metanol à temperatura ambiente, onde $\lambda_{exc} = 391$ nm.

Na figura 19 é apresentado o comportamento do complexo morin-Mg²⁺ após a adição de EDTA em termos da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de EDTA.

Figura 19 - Gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração EDTA adicionado a solução do complexo morin- Mg^{2+} .

Conforme exemplificado na equação 7, o EDTA tem preferência sobre os íons de magnésio bivalente. Logo, os íons de magnésio do complexo Morin- Mg^{2+} são sequestrados pelas moléculas de EDTA liberando o morin (forma menos fluorescentes devido a transferência de próton intramolecular) na solução, o que explica a diminuição na intensidade da fluorescência com a adição de EDTA.

Com os resultados de UV-vis e fluorescência estacionária foi possível comprovar que o flavonóide morin complexa-se com magnésio bivalente formando um complexo, conforme as alterações espectrais observadas.

4.1.2 Fluorescência resolvida no tempo

A relaxação (decaimento) de fluorescência de flavonóides são geralmente multiexponenciais devido à presença de diversos processos no estado excitado. Isto fica evidente na figura 20 que ilustra o decaimento multiexponencial do morin em metanol.

Figura 20 - Gráfico de decaimentos do (—) morin em metanol com $\lambda_{em} = 550$ nm.

A tabela abaixo ilustra os dados referentes ao decaimento triexponencial do morin.

Tabela 2 - Parâmetros relativos à curva de decaimento do flavonóide morin.

Componente	B_i	$f_i(\%)$	τ_i (ns)	χ^2
1	0,41	14	0,076	1,298
2	0,56	78	0,264	
3	0,03	8	2,100	

Para a análise dos parâmetros da curva de decaimento temos que χ^2 é o coeficiente de correlação linear, τ_i o tempo de vida que o fluoróforo permanece no estado excitado B_i o peso de cada componente na amostra e f_i a percentagem com que cada componente contribui a amostra.

Todos os decaimentos apresentam três componentes de tempo de vida. Contudo, com a adição de Mg^{2+} ocorre a formação do complexo morin- Mg^{2+} e o decaimento de fluorescência se modifica com a presença de componente com tempo de vida mais longo, coerente com o aumento do rendimento quântico de emissão. As figuras 21 e 22 apresentam a curva de decaimento do complexo morin- Mg^{2+} com $[Mg^{2+}]$ igual a 12 $\mu\text{mol/L}$ e 24 $\mu\text{mol/L}$ acompanhadas de suas tabelas com os respectivos parâmetros de decaimento.

Figura 21 - Decaimento do morin com $[Mg^{2+}] = 12 \mu\text{mol/L}$ com $\lambda_{em} = 495 \text{ nm}$.

A tabela 3 apresenta os parâmetros do decaimento triexponencial do morin com $[Mg^{2+}] = 12 \mu\text{mol/L}$.

Tabela 3 - Parâmetros relativos à curva de decaimento do flavonóide morin com $[Mg^{2+}] = 12 \mu L$.

Componente	B_i	$f_i(\%)$	$\tau_i (ns)$	χ^2
1	0,37	10	0,084	1,111
2	0,61	70	0,434	
3	0,02	20	2,835	

Na figura a seguir apresentamos o decaimento do complexo morin- Mg^{2+} com $[Mg^{2+}]$ igual a $24 \mu mol/L$.

Figura 22 - Decaimento do morin com $[Mg^{2+}] = 24 \mu mol/L$ com $\lambda_{em} = 495 nm$.

A tabela 4 expõe os parâmetros do decaimento triexponencial do morin com $[Mg^{2+}] = 24 \mu mol/L$

Tabela 4 - Parâmetros relativos à curva de decaimento do flavonóide morin com $[Mg^{2+}] = 24 \mu L$.

Componente	B_i	$f_i(\%)$	$\tau_i (ns)$	χ^2
1	0,40	11	0,082	1,071
2	0,57	68	0,375	
3	0,03	21	3,019	

A figura a seguir expõe as curvas de decaimento em algumas concentrações específicas do magnésio complexado com morin, bem como a do próprio flavonóide morin.

Figura 23 - Gráficos de decaimentos do (—) morin, (—) morin com $[Mg^{2+}] = 12 \mu mol/L$, (—) morin com $[Mg^{2+}] = 24 \mu mol/L$ em metanol e com $\lambda_{em} = 495 nm$.

As curvas exponenciais de relaxação nos permitiram observar que o complexo morin- Mg^{2+} apresenta um maior tempo de vida médio no estado excitado do que o flavonóide livre, principalmente pela inibição da transferência de próton intramolecular ao formar o complexo, apresentando um tempo de vida máximo de aproximadamente 3 ns.

4.2 Sistema morin com Ce^{3+}

4.2.1 Medidas de UV-vis e Fluorescência

Anteriormente discutimos a variação do comportamento espectral de uma solução diluída de morin após adição de magnésio bivalente. Uma abordagem semelhante será usada a seguir para descrever o efeito da adição de cério trivalente em uma solução de morin diluída com foco para o comportamento espectral de absorção e fluorescência. No espectro de absorção da figura 24, podemos notar claramente que a segunda banda de absorção do morin é deslocada para um comprimento de onda maior (deslocamento batocrômico) com a adição do cátion Ce^{3+} , demonstrando a existência de interação entre as espécies. O aparecimento do ponto isosbético no visível (em 412 nm) é uma evidência de que ocorre a formação do complexo com uma estequiometria definida.

Figura 24 - Espectro de absorção do morin puro (—) e do complexo morin-cério (demais cores), em metanol à temperatura ambiente.

A constante de formação, K_f , do complexo morin- Ce^{3+} em solução metanólica foi determinada fazendo uso do ajuste dos dados de absorbância UV-vis (deslocamento da banda de absorção para comprimentos maiores com a adição de Ce^{3+}) com a equação de Benesi-Hildebrand (apresentada na equação 8), conforme apresentado no gráfico de $1/\Delta A$ em função de $1/[\text{Ce}^{3+}]$ (figura 25).

$$\frac{[\text{F}]_0}{\Delta A} = \frac{1}{K_f \epsilon_c [\text{Ce}^{3+}]} + \frac{1}{\epsilon_c} \quad (8)$$

Onde:

$[\text{F}]_0$ é a concentração total do flavonóide (quantidade conhecida e fixa);

ΔA é a absorbância do complexo em um dado comprimento de onda, λ ;

$[\text{Ce}^{3+}]$ é a concentração do aceptor Ce^{3+} ;

ϵ_c é a absorvidade molar do complexo em um dado comprimento de onda e;

K_f é a constante de equilíbrio para a formação do complexo.

Figura 25 - Gráfico segundo a equação de Benesi-Hildebrand dos dados de absorbância do morin com Ce^{3+} em metanol à temperatura ambiente

Uma relação linear dos dados experimentais do gráfico da equação de Benesi-Hildebrand foi obtida para a formação do complexo morin- Ce^{3+} com coeficiente de correlação linear (R^2) igual a 0,99, o que indica que a relação estequiométrica é de razão de 1:1. Esta reação apresenta uma constante de complexação igual à $46 \times 10^6 \text{ mol/L}^{-1}$.

Na figura abaixo é apresentada uma proposta para o complexo 1:1 formado.

Figura 26 - Proposta de estrutura molecular para a associação do morin com Ce^{3+} na proporção 1:1 em metanol à temperatura ambiente.

A figura 27 apresenta os espectros de fluorescência estacionária para o complexo morin- Ce^{3+} excitado em 390 nm, 412 nm (ponto isosbético) e 432 nm (máximo de absorção do complexo Morin- Ce^{3+})⁴³.

(c)

Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência do morin puro (—) e do complexo morin-cério (demais cores) na presença de metanol à temperatura ambiente excitado em: (a) 390nm, (b) 412 nm e (c) 432 nm.

Analisando os gráficos de fluorescência acima, podemos perceber que a banda de fluorescência é deslocada para um comprimento de onda menor (deslocamento hipsocrômico), como consequência da associação do flavonóide com o cério trivalente. Podemos notar também que à medida que se aumenta a $[Ce^{3+}]$, observamos uma diminuição da fluorescência (supressão) do flavonóide, como de esperado, visto que o cátion cério trivalente é paramagnético. Logo, o complexado Morin- Ce^{3+} tende a ser não fluorescente.

Da figura 27 (a) observamos que a adição de cério trivalente até uma concentração de $20 \mu mol.L^{-1}$ ocasiona apenas uma diminuição da intensidade de fluorescência. Enquanto que, em concentrações maiores deste cátion, observa-se uma diminuição da intensidade de fluorescência acompanhada de um deslocamento para comprimentos de ondas de maior energia. Pode-se inferir que o morin apresenta duas formas em solução metanólica, uma forma dissociada e uma forma neutra, de acordo com a figura abaixo. Sendo assim, a complexação do cério trivalente ocorre primeiramente com a forma dissociada aniônica do morin e posteriormente com a forma neutra do flavonóide, causando o deslocamento hipsocrômico observado no espectro de fluorescência.

Figura 28 - Estruturas do flavonóide morin na forma (a) livre e (b) dissociada.

O complexo Morin- Ce^{3+} chegou a complexar, contudo não houve aumento de intensidade de fluorescência do complexo morin- Ce^{3+} , e sim supressão, o que não permitiu determinar o rendimento quântico para esta amostra. Consequentemente, a supressão gerada pela formação do complexo morin- Ce^{3+} não permitiu realizar estudos por microscopia de fluorescência.

Os dados relativos à razão de intensidade, I_0/I , (referente aos dados de fluorescência da figura 27) versus $[\text{Ce}^{3+}]$ são apresentados nas figuras abaixo.

Figura 29 - Gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de cério trivalente adicionado a uma solução de morin em metanol à temperatura ambiente e excitado em 390 nm.

Figura 30 - Gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de cério trivalente adicionado a uma solução de morin em metanol à temperatura ambiente e excitada em 412 nm.

Figura 31 - Gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de cério trivalente adicionado a uma solução de morin em metanol à temperatura ambiente e excitada em 432 nm.

Ao se analisar as figuras 29, 30 e 31, pode-se notar que os pontos em ambos os gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de cério trivalente formados não descrevem um comportamento linear. Esse comportamento é consistente com a presença de dois equilíbrios, um com a espécie de morin dissociado e outro com o morin livre. No entanto, a razão de associação é sempre mantida na proporção de 1:1, conforme as equações 9 e 10.

Desta forma, não se esperava que o comportamento do gráfico da razão de intensidade (I_0/I) versus a concentração de cério trivalente assumisse uma linearidade.

4.2.2 Fluorescência resolvida no tempo (decaimentos)

Para a obtenção do tempo de vida do estado eletrônico excitado do morin, a amostra foi excitada em 550 nm. O incremento de tempo foi de 0,01953 ns, sabendo que o menor limite de detecção é duas vezes o incremento de tempo. Então, para este experimento o limite de detecção foi de 0,03906 ns.

Tendo em vista a presença de diversos processos no estado excitado do morin (já discutido anteriormente), o seu decaimento de fluorescência apresenta caráter multiexponencial. A interação do íon cério trivalente com o flavonóide foi investigado por florescência resolvida no tempo, que geraram decaimentos de caráter multiexponencial, conforme demonstrado na figura abaixo.

Figura 32 - Gráficos de decaimentos do morin (—) livre, (—) com $[Ce^{3+}] = 7 \mu\text{mol/L}$, (—) com $[Ce^{3+}] = 14 \mu\text{mol/L}$, e (—) com $[Ce^{3+}] = 20 \mu\text{mol/L}$, com $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$.

Tabela 5 - Parâmetros relativos às curvas de decaimentos do flavonóide morin: livre e com $[Ce^{3+}] = 7, 14$ e $20 \mu\text{mol/L}$ e $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$.

Composto	Componente	B_i	$f_i(\%)$	$\tau_i \text{ (ns)}$	χ^2
Morin	1	0,49	22	0,119	1,178
	2	0,48	59	0,326	
	3	0,03	19	2,050	
Morin com $[Ce^{3+}] = 7 \mu\text{mol/L}$	1	0,59	25	0,128	1,039
	2	0,36	38	0,319	
	3	0,03	14	1,292	
	4	0,02	23	5,022	
Morin com $[Ce^{3+}] = 14 \mu\text{mol/L}$	1	0,68	27	0,129	1,036
	2	0,25	26	0,351	
	3	0,05	18	1,172	
	4	0,02	29	4,303	
Morin com $[Ce^{3+}] = 20 \mu\text{mol/L}$	1	0,57	19	0,108	1,123
	2	0,34	30	0,289	
	3	0,07	20	0,953	
	4	0,02	31	4,127	

Os dados de decaimento (tabela 5) indicam que a complexação do Ce^{3+} com morin leva a formação de um complexo não fluorescente ou luminescente. A reduzida modifica os tempos de vida, indicando que a complexação ocorre primeiramente com a forma aniônica (fase reduzida). Desta forma, a emissão do morin fica centrada na fase neutra (majoritária) que tem praticamente os mesmos tempos de vida da forma aniônica diferindo apenas pela presença de um componente mais longo de tempo de vida 4 – 5 ns com peso reduzido no decaimento.

Os sítios de complexação em que o metal cério trivalente pode se ligar ao flavonóide morin é pela carbonila da posição 4 com a hidroxila adjacente da posição 5, (baseado na enumeração efetuada na figura 9). Tendo em vista que a cavidade entre o átomo de oxigênio da carbonila 4 e a hidroxila da posição 3 apresenta um raio que varia de 0,80 a 0,90 Å. Sendo assim, podemos inferir que a interação do átomo de cério com o morin ocorre entre a carbonila da posição 4 com a hidroxila da posição 5, uma vez que o metal cério apresenta um raio maior que 0,90 Å (observe a figura 33). Enquanto que o magnésio bivalente possui um raio entre estes valores de tamanho da cavidade da carbonila da posição 4 e a hidroxila da posição 3. Logo, o magnésio sofre complexação com os grupamentos desta cavidade.

Figura 33 - Proposta de interação entre o cátion metálico e o flavonóide na razão de 1:1.

4.3 Sistema Corante-Mg²⁺ em nanozeólita

4.3.1 Medidas de UV-vis e Fluorescência

O corante *magnesium green* (figura 34) é uma sonda muito usada na marcação de magnésio, visto que forma uma espécie altamente emissiva. Este corante apresenta uma banda de absorção com máximo em 506 nm, enquanto que o máximo da emissão é em 534 nm, para ambas as soluções em meio aquoso, conforme pode ser visualizado na figura 35.

Figura 34 - Estrutura molecular do corante *magnesium green* (sal de potássio, C₃₃H₁₇Cl₂K₅N₂O₁₃).

Figura 35 - Espectros de absorção e emissão do *magnesium green* em solução aquosa à temperatura ambiente, na qual a diferença entre o máximo da absorção e o máximo da emissão (deslocamento de Stokes) foi de 28 nm para esta substância. Sendo o $\lambda_{exc} = \lambda_{abs, max} = 506$ nm.

Na figura acima observamos também um deslocamento de Stokes de 28 nm, onde o espectro de emissão de fluorescência está localizado em comprimentos de onda mais longos com respeito ao espectro de absorção, mas havendo a formação de uma pequena região de sobreposição espectral.

Analisando a figura 36 observamos que a intensidade de fluorescência aumenta à medida que se aumenta a concentração de Mg^{2+} . O comprimento de onda máximo da emissão do corante ($\lambda_{em} = 534$ nm) praticamente não sofre deslocamento da banda com a adição do Mg^{2+} ($\lambda_{em} = 536$ nm), apenas um aumento da intensidade de fluorescência devido a interação do corante com o cátion bivalente.

Figura 36 - Espectros de emissão do *magnesium green* (—) e do complexo corante-magnésio (demais cores) com a adição de solução de magnésio aquoso à temperatura ambiente.

4.3.2 Fluorescência resolvida no Tempo (decaimentos)

O decaimento de fluorescência do corante *magnesium green* em solução aquosa é triexponencial (figura 37), mediante à presença de diversos processos no estado excitado. A tabela 6 ilustra os dados de tempo de vida deste corante.

Figura 37 - Gráfico de decaimentos do corante *magnesium green* com $\lambda_{em} = 534$ nm.

A componente 1 da relaxação de fluorescência do corante apresenta um tempo de vida muito curto, enquanto que a componente 3 apresenta uma maior abundância com tempo de vida médio maior.

Tabela 6 - Parâmetros relativos à curva de decaimento multiexponencial do corante *magnesium green* com $\lambda_{em} = 536$ nm..

Componente	B_i	$f_i(\%)$	τ_i (ns)	χ^2
1	0,63	5,798	0,071	1,131
2	0,13	6,663	0,394	
3	0,24	87,539	2,765	

Com a adição do íon magnésio, as componentes 1, 2 e 3 da figura 38 e 39 passam a ter um tempo de vida maior, como observado nos dados da tabela 7 e 8 respectivamente, indicando que o corante associa-se ao magnésio. O

complexo formado apresenta uma componente com tempo de vida máximo por volta de 3 ns.

Figura 38 - Gráfico de decaimento do corante *magnesium green* com $[Mg^{2+}] = 1,22 \times 10^{-6}$ mol/L com $\lambda_{em} = 536$ nm.

Tabela 7 - Parâmetros relativos à curva de decaimento multiexponencial do corante *magnesium green* com $[Mg^{2+}] = 1,22 \times 10^{-6}$ mol/L para 3 componentes com $\lambda_{em} = 536$ nm

Componente	B_i	$f_i(\%)$	τ_i (ns)	χ^2
1	0,56	5,51	0,114	1,095
2	0,11	9,99	1,066	
3	0,33	84,50	2,930

Figura 39 - Gráfico de decaimento do corante *magnesium green* com $[Mg^{2+}] = 6,1 \times 10^{-6}$ mol/L com $\lambda_{em} = 536$ nm.

Tabela 8 - Parâmetros relativos à curva de decaimento multiexponencial do corante *magnesium green* com $[Mg^{2+}] = 6,1 \times 10^{-6}$ mol/L para 3 componentes com $\lambda_{em} = 536$ nm.

Componente	B_i	$f_i(\%)$	τ_i (ns)	χ^2
1	0,54	4,23	0,091	1,064
2	0,12	8,08	0,783	
3	0,34	87,69	2,976	

A tabela a seguir expõe os dados de tempo de vida médio para os decaimentos do corante e da interação do corante com $[Mg^{2+}] = 1,22 \times 10^{-6}$ e $6,1 \times 10^{-6}$ mol/L.

Tabela 9 – Tempo de vida médio calculado a partir dos parâmetros da curva de decaimento multiexponencial do corante *magnesium green* e do corante com $[Mg^{2+}] = 1,22 \times 10^{-6}$ e $6,1 \times 10^{-6}$ mol/L.

Tempo médio	Corante	$[Mg^{2+}] = 1,22 \times 10^{-6}$ mol/L	$[Mg^{2+}] = 6,22 \times 10^{-6}$ mol/L
$\langle \tau \rangle$	0,599 ns	2,588 ns	2,675 ns

A partir dos dados da tabela 9 podemos constatar que o tempo de vida médio do corante aumenta ao interagir com o íon Mg^{2+} , devido a formação de um complexo.

4.4 Imagens de fluorescência

4.4.1 Sistema Morin- Mg^{2+}

4.4.1.1 Microscopia de fluorescência confocal

A microscopia de fluorescência nos permite compreender um pouco acerca das propriedades fotofísicas do sistema em estudo. A seguir é apresentada uma imagem do complexo morin- Mg^{2+} em suporte de polivinilpirrolidona, com o seu respectivo espectro e decaimento.

Figura 40 - Imagem de fluorescência do sistema Morin- Mg^{2+} fixado em polivinilpirrolidona com $[Mg^{2+}] = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/L, onde o tamanho da barra corresponde a 2 μm com $\lambda_{em} = 473$ nm.

O morin possui uma emissão característica em 550 nm e após associação com magnésio bivalente o seu espectro de emissão é deslocado para uma absorção máxima em 495 nm. A figura a seguir apresenta o espectro de emissão da região em azul da figura 40. Podemos notar que a emissão da região selecionada apresenta um máximo deslocado para um comprimento de onda menor, tendendo a 500 nm. Logo, trata-se da emissão correspondente ao complexo e não ao flavonóide na forma pura ou dissociada.

Figura 41 - Espectros de emissão do sistema Morin-Mg²⁺ fixado em polivinilpirrolidona com [Mg²⁺] = 1,0 x 10⁻⁴ mol/L obtido à temperatura ambiente.

O morin tem um aumento considerável em seu rendimento quântico após complexação com magnésio bivalente. Isto pode ser verificado na curva de decaimento (figura 42) com a presença de uma componente de baixo peso e tempo de vida mais longo, por volta de 6 ns, conforme os dados contidos na tabela 10. Esta observação está em conformidade com os dados discutidos anteriormente para o estudo da relaxação de fluorescência em solução metanólica, no qual o complexo morin-Mg²⁺ apresenta uma um comportamento triexponencial com um de tempo de vida mais longo que o morin livre.

Figura 42 - Curva de decaimento triexponencial do sistema Morin-Mg²⁺ fixado em polivinilpirrolidona com [Mg²⁺] = 1,0 x 10⁻⁴ mol/L obtido à temperatura ambiente com λ_{em} = 495 nm.

Tabela 10 - Parâmetros relativos à curva de decaimento triexponencial do sistema Morin-Mg²⁺ fixado em polivinilpirrolidona com [Mg²⁺] = 1,0 x 10⁻⁴ mol/L obtido à temperatura ambiente e excitado em 500 nm.

Componente	B _i	f _i (%)	τ_i (ns)	χ^2
1	0,59	30,677	1,014	1,082
2	0,36	50,481	2,770	
3	0,05	18,842	6,704	

4.4.1.2 Microscopia de fluorescência de campo largo

As imagens por microscopia de fluorescência de campo largo do sistema Morin-Mg²⁺ fixado em polivinilpirrolidona foram excitadas com lasers em 405 e 473 nm.

4.4.1.2.1 Imagens obtidas com excitação em 405 nm

As imagens (a), (b) e (c) da figura 43 são do sistema morin-Mg²⁺ fixado em polivinilpirrolidona. Sobre estas imagens não foi possível realizar o estudo de intermitência, visto que, a complexação do morin com magnésio não gera intermitência de fluorescência significativa ao estudo neste suporte polimérico. Nas imagens mostradas abaixo temos aglomerados com tamanho superior a 2 µm bem como regiões fluorescentes com tamanho inferior a 2 µm.

Figura 43 – Imagem de fluorescência por microscopia de campo largo do sistema morin-Mg²⁺ fixado em polivinilpirrolidona com [Mg²⁺] = 1,0 x 10⁻⁶ mol/L, onde o tamanho da barra corresponde a 2 µm com λ_{exc} = 405 nm.

4.4.2.2 Imagens obtidas com excitação em 473 nm

Para as imagens obtidas com excitação em 473 nm observamos a formação de regiões fluorescentes (figura 44). O processo de associação flavonóide-metal favoreceu a investigação dessas estruturas por técnicas

microscópicas (confocal e de campo largo) visto que as espécies geradas apresentam fluorescência significativa que propicia ao seu estudo.

Figura 44 – Imagem de fluorescência por microscopia de campo largo do sistema Morin-Mg²⁺ fixado em polivinilpirrolidona com [Mg²⁺] = 1,0 x 10⁻⁶ mol/L, onde o tamanho da barra corresponde a 2 µm com $\lambda_{exc} = 473$ nm.

A excitação em 473 nm mostrou-se mais eficiente para o estudo deste sistema em base polimérica, visto que amostra apresentou maior estabilidade e resposta de sinal de fluorescência a excitação com este comprimento de onda.

4.4.2 Sistema corante-Mg²⁺ em nanozeólita

A taxa de fluorescência no estudo de moléculas não é constante ao longo do tempo, o que implica no conceito de intermitência de fluorescência (do inglês *blinking*), isto é, alternância entre estados de alta fluorescência (definido como *on*) e baixa ou ausência de fluorescência (definido como *off*), sendo esta técnica empregada principalmente no estudo de partículas individuais^{28; 30; 58; 59}. Os dados de intermitência de fluorescência do corante *magnesium green* complexado com magnésio bivalente em nanozeólita excitado em 473 nm

Na figura 45 temos uma imagem de desvio padrão, sobre a qual foi selecionado uma região (1) para se examinar a intermitência de fluorescência.

Figura 45 - Imagem de fluorescência por microscopia de campo largo do sistema corante- Mg^{2+} excitado em 473 nm com tamanho da barra de 2 μm .

Na figura abaixo temos os resultados gráficos gerados para o centroide 1 da figura 45, sobre a qual pode-se notar que o limite (*threshold*) está representado pela linha verde pontilhada em 270 contagens para os resultados de evolução temporal de intermitência (Gráfico esquerdo superior da figura 46).

Figura 46 - Resultados gráficos do centroide 1 da imagem de fluorescência da figura 45 do sistema corante- Mg^{2+} excitado em 473 nm com tamanho da barra de 2 μm .

Para o estudo da evolução temporal de intermitência converteu-se os dados em um sistema binário, no qual é atribuído um valor zero para os valores abaixo do limite e um valor de 1 para os valores acima do limite. Assim, um gráfico do tipo *On(1)-Off(0)* é apresentado no gráfico do canto direito superior da figura 46.

No gráfico direito inferior da figura 46 temos o histograma de fluorescência da partícula 1 da figura 45.

Com esta imagem foi possível obter um sinal de intermitência de fluorescência e assim constatar que o íon magnésio bivalente estar presente na estrutura investigada.

4.4.3 Sistema Morin-Mg²⁺ em nanozeólita

Com a finalidade de usar um corante de menor custo em relação ao *magnesium green* para marcação de Mg²⁺ optamos pelo uso do flavonóide morin. Nesta secção expomos os resultados de intermitência de fluorescência do morin inseridos em nanozeólita.

Nas figuras ao longo desta seção, são apresentadas imagens do sistema morin-Mg²⁺ em nanazeólita estudado por microscopia de fluorescência de campo largo excitado em 473 nm. Na figura 47 expomos três imagens de microscopia de fluorescência de campo largo: imagem de saturação total, imagem de desvio padrão e a imagem de transmissão óptica.

Figura 47 - Imagem de fluorescência por microscopia de campo largo do sistema morin-Mg²⁺ excitado em 473 nm com tamanho da barra de 2 μ m. Onde (a) é a imagem com saturação total, (b) a imagem com desvios e (c) a imagem de transmissão óptica.

Na figura 48 (b) temos uma imagem de desvio padrão, sobre a qual se examinou a intermitência de fluorescência da região 1, conforme destacado na imagem abaixo.

Figura 48 - Imagem de fluorescência por microscopia de fluorescência de campo largo do sistema morin- Mg^{2+} excitado em 473 nm com tamanho da barra de 2 μm .

Na figura 49 temos os resultados gráficos gerados para o centroide 1 da figura 48, onde o limite (*threshold*) está representado pela linha pontilhada em 7000 contagens para os resultados de evolução temporal de intermitência (gráfico esquerdo superior da figura 49).

Um gráfico do tipo *On(1)-Off(0)* é apresentado no gráfico do canto direito superior da figura 49. Enquanto, que o gráfico do canto direito da figura 49 corresponde ao histograma de fluorescência da partícula 1 da figura 48.

Figura 49 - Resultados gráficos do centroide 2 da imagem de fluorescência da figura 48 do sistema morin- Mg^{2+} excitado em 473 nm.

A partir da análise dos dados de intermitência de fluorescência para sistema corante- Mg^{2+} e do sistema morin- Mg^{2+} podemos inferir que o sistema morin- Mg^{2+} se torna uma ferramenta apropriada para a marcação de magnésio bivalente, por ser uma substância de baixo custo e de eficiência moderada.

CAPÍTULO 5:

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÃO

Com o presente estudo foi possível constatar que o flavonóide morin interage com os íons de magnésio bivalente formando complexos na razão de 1:1 e 2:1 (morin : metal) e com íons de cério trivalente na razão de 1:1.

A utilização das técnicas espectroscópicas de absorção do UV-vis e de fluorescência estacionária mostrou-se efetiva na investigação de ambos os complexos formados, principalmente pelas alterações geradas nos espectros (absorção e emissão). Os espectros de emissão de fluorescência mostram que a formação do complexo morin-Mg²⁺ gera um produto de maior fluorescência (aumenta o rendimento quântico de fluorescência) que possibilitou realizar estudos por microscopia de fluorescência. Todavia, a associação do cério com morin forma um complexo não fluorescente ou muito pouco fluorescente (supressão da fluorescência) que inviabiliza o estudo por microscopia de fluorescência.

Os decaimentos de fluorescência da associação do morin com os íons magnésio e cério são multiexponenciais e ambos os complexos são caracterizados pela presença de componentes com tempo vida maiores.

Nos experimentos por microscopia de fluorescência foi possível resolver espacialmente as imagens do complexo morin-Mg²⁺, mostrando que o morin pode ser usado como um marcador eficiente e barato para marcação do magnésio, ao se comparar principalmente os feitos obtidos com o marcador magnesuim green (marcador altamente eficiente e de elevado custo) suportado em nanozeólita.

6 REFERÊNCIAS

- [1] - ZHANG, J.; YU, C.; QIAN, S.; LU, G.; CHEN, J. A selective fluorescent chemosensor with 1, 2, 4-triazole as subunit for Cu (II) and its application in imaging Cu (II) in living cells. **Dyes and Pigments**, v. 92, n. 3, p. 1370-1375, 2012.
- [2] - FERAPONTOVA, E. E.; MOUNTFORD, C. P.; CRAINC, J.; BUCKD, A. H.; DICKINSON, P.; BEATTIE, J. S.; GHAZALI, P.; TERRY, J.G.; WALTONE, A.J.; MOUNTB, A. R. Electrochemical control of a DNA Holliday junction nanoswitch by Mg^{2+} ions. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, n. 3, p. 422-428, 2008.
- [3] - PENG, M.; SHI, S.; ZHANG, Y. Influence of Cd^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} on (+)-catechin binding to bovine serum albumin studied by fluorescence spectroscopic methods. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 85, n. 1, p. 190-197, 2012.
- [4] - OSANAI, T.; KURODA, S.; SUGIYAMA, T.; KAWABORI, M.; ITO, M.; SHICHINOHE, H.; KUGE, Y.; HOUKIN, K.; TAMAKI, N.; IWASAKI, Y. Therapeutic effects of intra-arterial delivery of bone marrow stromal cells in traumatic brain injury of rats-in vivo cell tracking study by near-infrared fluorescence imaging. **Neurosurgery**, v. 70, n. 2, p. 435-444, 2012.
- [5] - AVILOV, S. V.; MOISY, D.; MUNIER, S.; SCHRAIDT, O.; NAFFAKH, N.; CUSACK, S. Replication-competent influenza A virus that encodes a split-green fluorescent protein-tagged PB2 polymerase subunit allows live-cell imaging of the virus life cycle. **Journal of Virology**, v. 86, n. 3, p. 1433-1448, 2012.
- [6] - RASINES, B.; SÁNCHEZ-NIEVES, J.; MOLINA, I. T.; GUZMÁN, M.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; GÓMEZ, R.; LA MATA, F. J. Synthesis and fluorescent properties of cationic carbosilane dendrimers containing eugenol linkers for their use in biomedical applications. **New Journal of Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 360-370, 2012.
- [7] - GRADOVNA, A.; SCHOLZ-STARKE, J.; GUTLA, P.V.; CARPANETO, A. Fluorescence combined with excised patch: measuring calcium currents in plant cation channels. **Plant Journal**, v. 58, n. 1, p. 175-182, 2009.
- [8] - ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques**. 2nd edition. Chichester: John Wiley, 2000. 600 p.

[9] - DRUMMEN, G. P. C. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques - illuminating biological and biomedical research. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14067-14090, 2012.

[10] - MONDAL, P. P.; DIASPRO, A. **Fundamentals of fluorescence microscopy**: Exploring life with light. New York: Springer, 2014. 219 p.

[11] - LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. 954 p.

[12] - LIU, H.; WANA, X.; LIU, T.; LI, Y.; YAO, Y. Cascade sensitive and selective fluorescence OFF-ON-OFF sensor for Cr³⁺ cation and F⁻ anion. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 200, p. 191-197, 2014.

[13] - CASTLEMAN, K. R.; MERCHANT, F. A.; WU, Q. **Microscope image processing**. London: Academic Press, 2008. 541 p.

[14] - ZHANG, H.-X.; LIU, E. Spectroscopic and molecular modeling investigation on the binding of a synthesized steroidal amide to protein. **Journal of Luminescence**, v. 153, p. 182-187, 2014.

[15] - BEREZIN, M. Y.; ACHILEFU, S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2641-2684, 2010.

[16] - LAKOWICZ, J. R.; GRZYCZYNSKI, I. **Topics in fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 2006. 454 p.

[17] - NAKAEMA, M. K. K.; SANCHES, R. Frequency-domain fluorometry. **Quimica Nova**, v. 22, n. 3, p. 412-416, 1999.

[18] - STUDER, V.; BOBIN, J.; CHAHID, M.; MOUSAVI, H. S.; CANDES, E.; DAHAN, M. Compressive fluorescence microscopy for biological and hyperspectral imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. E1679-E1687, 2012.

[19] - DAVIDSON, M. W.; ROSS, S. T.; R, A. J. Single molecule localization microscopy for superresolution. **Journal of Optics**. v. 15, p.1-15, 2013.

- [20] - BAI, L.; XIE, Z.; CAO, K.; ZHAO, Y.; XU, H.; ZHU, C.; UM, Z.; ZHONG, Q.; GU, Z. Hybrid mesoporous colloid photonic crystal array for high performance vapor sensing. **Nanoscale**, v. 6, n. 11, p. 5680-5685, 2014.
- [21] - ALENCAR, L. D. S.; PILLA, V.; ANDRADE, A. A.; DONATTI, D. A.; VOLLET, D. R.; VICENTE, F. S. High fluorescence quantum efficiency of CdSe/ZnS quantum dots embedded in GPTS/TEOS-derived organic/silica hybrid colloids. **Chemical Physics Letters**, v. 599, p. 63-67, 2014.
- [22] - TRAUB, M. C.; VOGELSANG, J.; PLUNKETT, K.; NUCKOLLS, C.; BARBARA, P.; BOUT, V. Unmasking bulk exciton traps and interchain electronic interactions with single conjugated polymer aggregates. **Acs Nano**, v. 6, n. 1, p. 523-529, 2012.
- [23] - THOMSON, C.; LOWE, R.; PAGE, D.R.; RAGAUSKAS, A. J. Exploring fibre-fibre interfaces via FRET and fluorescence microscopy. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 34, n. 2, p. 113-120, 2008.
- [24] - ZHOU, X.; CHOUDHARY, E.; ANDOY, N. A.; ZOU, N.; CHE, P. Scalable parallel screening of catalyst activity at the single-particle level and subdiffraction resolution. **Acs Catalysis**, v. 3, n. 7, p. 1448-1453, 2013.
- [25] - TACHIKAWA, T.; YONEZAWA, T.; MAJIMA, T. Super-resolution mapping of reactive sites on titania-based nanoparticles with water-soluble fluorogenic probes. **Acs Nano**, v. 7, n. 1, p. 263-275, 2013.
- [26] - SMALL, A.; STAHLHEBER, S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy. **Nature Methods**, v. 11, n. 9, p. 971-971, 2014.
- [27] - MARX, V. Is super-resolution microscopy right for you? **Nature Methods**, v. 10, n. 12, p. 1157-1163, 2013.
- [28] - WOLL, D.; BRAEKEN, E.; DERES, A.; SCHRYVER, F.; UJI-I, H.; HOFKENS, J. Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn? **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 313-328, 2009.
- [29] - BAKER, M. Faster frames, clearer pictures. **Nature Methods**, v. 8, n. 12, p. 1005-1009, 2011.
- [30] - TACHIKAWA, T.; MAJIMA, T. Single-molecule, single-particle approaches for exploring the structure and kinetics of nanocatalysts. **Langmuir**, v. 28, n. 24, p. 8933-8943, 2012.

- [31] - SILBERBERG, M.; MORAND, C.; MATHEVON, T.; BESSON, C.; MANACH, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. **European Journal of Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 88-96, 2006.
- [32] - HERTOOG, M. G. L.; FESKENS, E. J.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-disease - the Zutphen elderly study. **Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1007-1011, 1993.
- [33] - COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.
- [34] - PANHWAR, Q. K.; MEMON, S.; BHANGER, M. I. Synthesis, characterization, spectroscopic and antioxidation studies of Cu(II)-morin complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 967, n. 1-3, p. 47-53, 2010.
- [35] - MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 212, p. 125-AGFD, 1996.
- [36] - JULLIAN, C.; MOYANO, L.; YAÑEZ, C.; OLEA-AZAR, C. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 67, n. 1, p. 230-234, 2007.
- [37] - _____. Complexation of morin with three kinds of cyclodextrin - A thermodynamic and reactivity study. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 1, p. 269-275, 2008.
- [38] - JABEEN, E.; JANJUA, N. K.; HAMEED, S. beta-Cyclodextrin assisted solubilization of Cu and Cr complexes of flavonoids in aqueous medium: A DNA-interaction study. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 191-196, 2014.
- [39] - GUTIERREZ, A. C.; GEHLEN, M. H. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al³⁺. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 58, n. 1, p. 83-89, 2002.

- [40] - HOU, Y. C.; CHAO, P. D.; HO, H. J.; WEN, C. C.; HSIU, S. L. Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 199-203, 2003.
- [41] - ALONSO-MATEOS, A.; ALMENDRAL-PARRA, M. J.; CURTO-SERRANO, Y.; RODRÍGUEZ-MARTÍN, F. J. Online monitoring of aluminium in drinking water with fluorimetric detection. **Journal of Fluorescence**, v. 18, n. 1, p. 183-192, 2008.
- [42] - ANSARI, A. A. Paramagnetic NMR shift, spectroscopic and molecular modeling studies of lanthanide(III)-morin complexes. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 61, n. 23, p. 3869-3878, 2008.
- [43] - WOZNICKA, E.; KOPACZ, M.; UMBREIT, M.; KLOS, J. New complexes of La(III), Ce(III), Pr(III), Nd(III), Sm(III), Eu(III) and Gd(III) ions with morin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 5, p. 774-782, 2007.
- [44] - ENSAFI, A. A.; HAJIAN, R.; EBRAHIMI, S. Study on the interaction between morin-bi(III) complex and DNA with the use of methylene blue dye as a fluorophor probe. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 266-276, 2009.
- [45] - JIA, R. P.; SHENA, Y.; LUOA, H.; CHENA, X.; HUA, H.; XUE, D. Photoluminescence properties of morin and lysozyme molecules absorbed on anodic porous alumina membrane. **Applied Surface Science**, v. 233, n. 1-4, p. 343-351, 2004.
- [46] - XIE, M.-X.; LONG, M.; LIU, Y.; QIN, C.; WANG, Y. D. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1760, n. 8, p. 1184-1191, 2006.
- [47] - LIU, E.; ZHANG, H.-X. Interaction of the La(III)-morin complex with human serum albumin. **Journal of Solution Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1402-1413, 2014.
- [48] - PANHWAR, Q. K.; MEMON, S. Synthesis of Cr(III)-morin complex: characterization and antioxidant study. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

[49] - NASO, L. G.; LEZAMA, L.; ROJO, T.; ETCHEVERRY, S. B.; VALCARCEL, M.; ROURA, M.; SALADO, C. FERRER, E. G.; WILLIAMS, P. A. M. Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as antio-xidant and specific anti-cancer agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 2, p. 289-301, 2013.

[50] - WANG, P.; YUAN, B. F.; LI, N. B.; LUO, H. Q. A new dual-channel optical signal probe for Cu^{2+} detection based on morin and boric acid. **Applied Spectroscopy**, v. 68, n. 10, p. 1148-1153, 2014.

[51] - ZDYB, A.; KRAWCZYK, S. Adsorption and electronic states of morin on TiO_2 nanoparticles. **Chemical Physics**, v. 443, p. 61-66, 2014.

[52] - ROSU, M.-C.; SUCIU, R.-C.; MIHET, M.; BRATU, I. Physical-chemical characterization of titanium dioxide layers sensitized with the natural dyes carmine and morin. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 16, n. 6, p. 1551-1557, 2013.

[53] - ZHANG, H.; CAO, J.; WANG, Y. Spectroscopic and molecular modeling studies of the interaction between morin and polyamidoamine dendrimer. **Luminescence**, v. 29, n. 6, p. 573-578, 2014.

[54] - LEE, J.; SHIN, Y. K.; LEE, K. W. Protective mechanism of morin against ultraviolet B-induced cellular senescence in human keratinocyte stem cells. **International Journal of Radiation Biology**, v. 90, n. 1, p. 20-28, 2014.

[55] - TURRO, N. J. From boiling stones to smart crystals: Supramolecular and magnetic isotope control of radical-radical reactions in zeolites. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 9, p. 637-646, 2000.

[56] - GARCIA, R.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, V.; LIANO, R. S.; LÓPEZ-ARBELOA, I.; PÉREZ-PARIENTE, J. One-dimensional antenna systems by crystallization inclusion of dyes (one-pot synthesis) within zeolitic MgAPO-36 nanochannels. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 45, p. 24063-24070, 2013.

[57] - NEVES, I. C.; CUNHA, C.; PEREIRA, M. R.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, A. M. Optical properties of nanostructures obtained by encapsulation of cation chromophores in Y zeolite. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 24, p. 10719-10724, 2010.

[58] - DE CREMER, G.; SELS, B. F.; VOS, D. E.; HOFKENS, J.; ROEFFAERS, M. B. J. Fluorescence micro(spectro)scopy as a tool to study catalytic materials in action. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 12, p. 4703-4717, 2010.

[59] - JANSSEN, K. P. F.; CREMER, G. D.; NEELY, R.; KUBAREV, A. V.; LOON, J. V.; MARTENS, J. A.; VOS, D. E.; ROEFFAERS, M. B. J.; HOFKENS, J. Single molecule methods for the study of catalysis: from enzymes to heterogeneous catalysts. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 4, p. 990-1006, 2014.